第18卷 第3期　　昆 虫 学 报　　Vol. 18. No. 3
1975年8月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　August, 1975

蜡螟杆菌"010"抗噬菌体菌株的选育和苏芸金杆菌类噬菌体的研究

沙槎云　任改新　谢强江
(中国科学院北京动物研究所)

苏芸金杆菌作为微生物农药，已在国内外广泛生产应用。但在生产中往往受到噬菌体的侵染，严重地影响这种微生物农药的应用和发展。蜡螟杆菌"010"(简称"010")是我组于1964年自蜜蜂死亡幼虫体内分离出的一种对人畜无害的中温好气性芽孢杆菌。北京动物研究所(1973)鉴定为苏芸金杆菌蜡螟变种(*Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*)。它对多种鳞翅目害虫有高效的毒杀作用，田间防治菜青虫(*Pieris rapae*)、稻苞虫(*Parnara guttata*)、松毛虫(*Dendrolimus punctatus*)、稻纵卷叶螟(*Cnaphalocrocis medinalis*)、杨天社蛾(*Melalopha* (*Pygaera*) *anachoreta*)等试验效果显著。死亡率一般都在90—95%，个别如菜青虫在24小时内其毒效可达100%。本病原虽采自蜜蜂，但据刘崇乐等(1962)的报道，苏芸金杆菌类的细菌对蜜蜂口服的致死中量(LD_{50})剂量相当高，是在一般情况下不易为蜜蜂碰到的高剂量，因而在实际生活中对养蜂业的威胁不大。

我组于1970—72年相继在北京市南苑化工厂和本所微生物农药车间进行了试制生产。生产中遇到了菌数突然下降，发酵不能正常进行以致倒罐的情况，1972年经过对发酵液和车间环境采样的分检，都证实了发酵不正常主要是噬菌体侵染的结果。

本试验主要探索"010"抗噬菌株的选育方法和对38号苏芸金杆菌类噬菌体某些特性的研究。

一、材　　料

菌株　标准血清型菌株009, 021, E-3, 016, E-010, 096, 012, 013(武汉大学生物系供给); 457, 010, 001, 011, 306(本所保存)。

噬菌体　自本所及北京市天坛绿化处微生物农药车间的菌株、发酵液及环境样品中分离，并收集了武汉、长沙、杭州、广州、上海等地样品。

1. 普通培养基　营养肉汤; 2%营养肉汤琼脂; 0.7%营养肉汤琼脂; 1%蛋白胨水。灭菌前pH 7.2。

2. I号培养基　豆饼粉1%，淀粉1%，玉米浆2%，$CaCO_3$ 0.1%，灭菌前pH 8.0。

3. II号培养基　麦芽胚粉4%，豆饼粉2.4%，玉米浆2%，$CaCO_3$ 0.1%，灭菌前pH 8.0。

二、方　　法

噬菌体的分离及纯化，根据Adams 1959的方法。

高效价噬菌体原液的制备：固体法，根据 Adams 1959 的方法。

液体法　桃单个噬菌斑至 1—2 毫升营养肉汤中，于 30℃ 活化 2—3 小时。然后加到 40 毫升年青指示菌培养液中，摇床培养 3—4 小时后培养液变清，随即再加入平板培养年青指示菌使其再一次增殖，约 3—4 小时后培养液澄清，以 4000 转/分离心 20 分钟，上清液以 G_5（进口）或 G_6（国产）细菌滤器过滤除菌，效价一般可达 10^{11} 单位/毫升左右。

噬菌体寄主范围的测定　将欲测菌株倒成上层平板，然后以不同的噬菌体点布于上。观察其溶菌情况以确定其寄主，视其噬菌斑出现之先后初步比较其裂解速度。

噬菌体的热稳定性试验参考 Colasito 等 1969 的方法。取每毫升约 10^{4-5} 个噬菌体的蛋白胨水稀释液 1 毫升，以 65℃ 水浴恒温处理 5、10、15、20、25、30 分钟，然后用冰水迅速冷却，取 0.1 毫升作成双层平板，观察其失活情况。又另将稀释液以 100℃ 处理 1、3、5、7、9、11、13 分钟，冰水迅速冷却，点布于带有指示菌的双层平板上，观察其失活情况。

噬菌体形态的电子显微镜观察　将纯化的新鲜噬菌斑直接以针刺法浸入一滴 0.01M 乙酸钠缓冲液内，再加一滴 pH 7.0 的 2% 的磷钨酸负染，然后将有胶膜的网板覆于混合液上。稍待，轻轻取下沾有样品的网板，置于干燥器内干燥，在 26,000—40,000 倍电子显微镜下观察其形态。

抗噬菌体菌株的选育

抗株筛选，主要根据《微生物学革命资料汇编》1969，1970 年报道的方法。

发酵试验　150 立升发酵罐装 100 立升 I 号培养基，接入 2000 毫升对数生长期的抗株种子液，并同时接入 500 毫升效价为 5×10^{10} 单位/毫升的噬菌体原液（菌数与噬菌体之比为 1:100）。以 210 转/分速度搅拌，罐压为 0.4—0.5 公斤/厘米^2，罐温为 30℃ 的条件进行发酵考察。

抗株毒力测定　以饲料浸蘸每克含孢子 160 亿的菌粉悬浮液，稍干，饲喂幼龄鳞翅目幼虫，试验温度为 25—28℃，以“010”作对照，观察比较其毒力差异。

三、结果和讨论

抗株性能

1. 以敏感菌株“010”和自本所微生物农药车间分离出的噬菌体 G_9 经过三次液体初筛、三次固体平板复筛、两次摇瓶复筛，选出菌落似原始型（I 型）的抗株 7 株，菌落呈乳突状（II 型）的抗株 3 株共 10 株。它们抗 G_9 能力强，产生的伴孢晶体大，在摇瓶复筛时菌数均比对照“010”高。

2. 选择了上述抗株中菌数较高，且菌落形态不同的三株 R_{03-2}，R_{29-2}（I 型），和 R_{62-5}（II 型）作了 150 立升的罐上考察*（表 1）。结果表明对 G_9 有良好抗性，发酵过程中菌形整齐，芽孢、伴孢晶体形成比较一致，发酵液 pH 的变化合乎规律。以 R_{03-2} 为例，发酵周期为 22—26 小时，发酵液菌数平均为 24 亿/毫升。在换用II号培养基后，发酵 8 小时后增加通气量，发酵液菌数增至 55—62 亿/毫升。

3. 上述三株抗株保持了“010”的杀虫毒力（表 2）。

---

* 本工作在我所微生物农药车间进行。

表 1　抗株 150 立升发酵罐考察试验

抗株		pH变化 时间（小时） 4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	生长周期（小时）	采收菌数（亿/毫升）	培养基	通气量（m³/小时） 8小时前	8小时后	种子液
I型	R$_{03-2}$	*7.0	7.0	7.3	7.4	7.5	7.5	7.5	7.5							未采收	I	3.6	4.8	营养体
		6.9	6.8	7.0	7.3	7.5	8.0	8.0	8.0						18	31.8	I	3.6	4.8	营养体
		7.1	7.0	7.0	6.8	6.8	7.0	7.2	7.3	7.5	7.5	7.5			24	19.5	I	3.6	3.6	孢子
		7.0	6.8	6.7	6.7	7.0	7.3	7.4	7.4	7.4	7.5	7.8	8.0		26	24.7	I	3.6	4.8	孢子
		7.0	6.8	6.6	6.8	7.2	7.5	7.6	7.8	7.8	7.8				22	25.7	I	3.6	6.0	孢子
		7.0	6.8	6.6	6.8	7.5	7.5	7.6	7.8	7.8	7.8				22	27.6	I	3.6	6.0	孢子
		6.8	6.8	6.0	6.6	6.8	7.0	7.0	7.2	7.8	8.0	8.0			24	62.3	II	3.6	6.0	孢子
		6.5	6.5	6.0	6.5	6.8	7.2	7.2	7.5	7.5	7.8	7.8	8.0		26	55.0	II	3.6	6.0	孢子
	R$_{29-2}$	7.2	7.0	7.0	7.0	6.8	6.6	7.3	7.4	7.5	7.5	7.5	7.8	7.8	28	27.3	I	3.6	4.8	孢子
II 型	R$_{62-5}$	7.2	7.2	7.0	7.0	7.0	7.2	7.2	7.5	7.5	7.6	7.6	7.6	8.0	28	21.1	I	3.6	4.8	孢子
对照“010”		6.6	6.5	6.5	6.5	6.8	7.0	7.4	7.7	8.0	8.3				22	36.0	II	3.6	6.0	孢子

* 加噬菌体 G$_9$ 500 毫升，发酵正常，菌形整齐。

表 2　抗 株 毒 力 比 较 试 验

试虫	菌种	稀释倍数	试虫数	死亡情况 一天	二天	三天	四天	死亡数	死亡率（%）	备注
菜青虫	R$_{03-2}$	1000	10	2	5	2	1	10	100	试虫龄期 3—5 龄
	R$_{62-5}$	1000	10	6	4			10	100	
	对照“010”	1000	10	3	7			10	100	
粘虫	R$_{03-2}$	100	20	1	6	8	2	17	85	试虫龄期 3 龄末至 4 龄初
		200	20	0	4	16		20	100	
	R$_{62-5}$	100	20	0	7	13		20	100	
		200	20	0	3	17		20	100	
	对照“010”	100	20	0	4	16		20	100	
		200	20	1	0	18	1	20	100	
天社蛾	R$_{03-2}$	1000	10	8	2			10	100	试虫龄期 3—4龄
	R$_{62-5}$	1000	10	8	2			10	100	
	对照“010”	1000	10	7	3			10	100	

注：每克菌粉孢子数 160 亿。

4. 三株抗株对噬菌体 G$_9$ 有良好抗性。但对其他噬菌体的抗性却表现了明显的差别（表 3）。

在生产上防止苏芸金杆菌受噬菌体侵染，以噬菌体为生物因子筛选抗株的方法，工作量虽大一些，但仍属方便可行，并能得到抗性强、毒力与生物特性保持原株的良好性能的抗株。但以一种噬菌体来筛选有一定局限性，如能在选前仔细地了解本地区的噬菌体情

表 3　抗株抗性测定

噬菌体 / 抗株	G_5	G_8	G_9	T_2	D_3	注
R_{03-2}	+	−	−	−	+	"+"有噬菌斑
R_{62-5}	−	+	−	−	−	"−"无噬菌斑
R_{29-2}	+	+	−	−	+	
对照"010"	+	+	+	−	+	

况，进行多噬菌体筛选抗株，结合环境卫生措施，菌株的轮换使用，防止噬菌体的侵染定属可能。有关抗株性能的遗传等问题，有待进一步研究探讨。

噬菌体

1. 不同来源的 38 号噬菌斑样品的形态，可归纳为五种类型：1）点状（T_2）；2）圆形、透明、边缘整齐，直径 1—1.5 毫米。如 G_9；3）呈同心圆、中心点直径 0.5—1 毫米，边缘不整齐，如 G_5；4）圆形、透明、斑外有一较菌苔下凹的半透明区，直径 2 毫米，如 G_8；5）圆形、斑外有一半透明圈，半透明圈与斑交接处略增厚，直径 2—3 毫米，如 D_3（见图 1）。

2. 从噬菌体的寄主范围（表 4）看出，以 457 为指示菌的噬菌体 T_2 和以杀螟杆菌、青虫菌、"010"为指示菌的 G_5、G_8、G_9 对其所属血清型 H_1 和 H_5 的所测菌株均有专属性，但对其他血清型菌株也有交叉感染。而以松蠋杆菌为指示菌的 D_3 则较明显地表现了有交叉感染。

3. 结合噬菌斑的形态和寄主范围，选择了有不同血清型寄主和有同一血清型寄主而噬菌斑形态差异较大的五个代表作了电子显微镜的观察（图 2）。它们的形态有明显的区别。T_2 头呈圆形，但前端略尖，有一弯曲长尾。D_3 头亦呈圆形，有直尾，尾自基部逐渐变细。G_5、G_8、G_9 头均为椭圆形，G_8 头部较 G_9 略大，均有一弯曲的尾部，但 G_9 尾部似有结状尾器官，而 G_5 的尾部远较 G_8、G_9 为短。

4. 噬菌体在 100℃ 下处理不同时间后，全部失活，样品 4℃ 下保存 24 小时后无复苏现象。经 65℃ 处理不同时间后，各处理均有失活，但其失活率和处理时间不成正比例（图 3）。T_2、D_3 与 G_5、G_8、G_9 有明显的区别，而 G_8、G_9、G_5 之间亦有差异。值得提出的是 65℃ 处理后，4℃ 保存24小时后噬菌体有复苏现象，双层平板测定时噬菌斑显著增多。

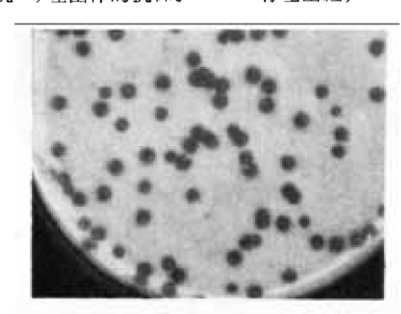
根据上述试验，将噬菌体分为五种类型 T_2、D_3、G_5、G_8、G_9。关于苏芸金杆菌类的噬菌体，《微生物学革命资料汇编》第五集（1970）曾有报道，本文就寄主范围和噬菌斑的形态方面与其有所不同。而国外 Colasito（1969），Chapman（1966），Yoder（1960），Раутенштейн（1964，1971）等的报道，与上述五种类型亦各有差异。

通过探索选育方法，了解不同类型噬菌体的特性和它们对寄主的关系将有助于进一步开展防止噬菌体侵染的研究。选育抗噬菌体菌株时，可根据噬菌体的寄主范围选择不同噬菌体进行多噬菌体筛选抗株。特别在筛选出新病原菌后，应了解其对噬菌体的抗性以便在生产中选择应用。

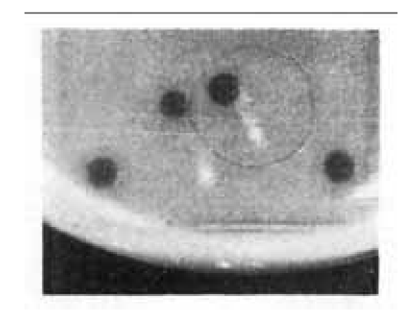
表 4　噬菌体寄主范围测定

细菌			噬菌体				
血清型	变种	菌号	G_5	G_8	G_9	T_2	D_3
H_1	*B. thuringiensis* var. *berliner*	009	−	−	−	+	−
		457	−	−	−	+	+
H_2	*B. thuringiensis* var. *finitimus*	021	−	−	−	+	−
H_3	*B. thuringiensis* var. *alesti*	E-3	+	−	−	−	−
H_4	*B. thuringiensis* var. *sotto*	016	+	−	−	+	−
	B. thuringiensis var. *dendrolimus*	306	−	−	−	+	+
H_5	*B. thuringiensis* var. *galleriae*	010	+	+	+	−	+
		001	+	+	+	−	+
		011	+	+	+	−	+
		*R_{03-2}	+	−	−	−	+
		*R_{62-5}	−	+	−	−	−
		*R_{29-2}	+	+	−	−	+
H_6	*B. thuringiensis* var. *entomocidus*	E010	−	−	−	+	+
H_7	*B. thuringiensis* var. *aizawai*	096	−	−	−	+	+
H_8	*B. thuringiensis* var. *morrison*	012	−	−	−	−	−
H_9	*B. thuringiensis* var. *tolworth*	013	+	−	−	+	−
裂解速度			快	中	中	中	慢

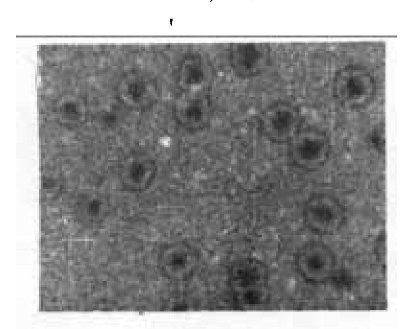
* 抗 G_9 噬菌体的抗株。　"＋"有噬菌斑，"－"无噬菌斑。



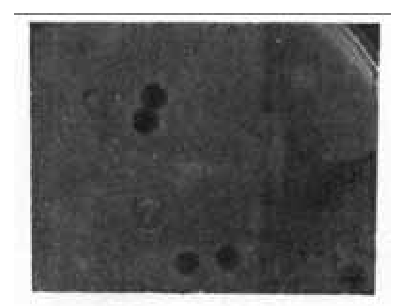
G_9　1×



G_8　3×



G_5　3×



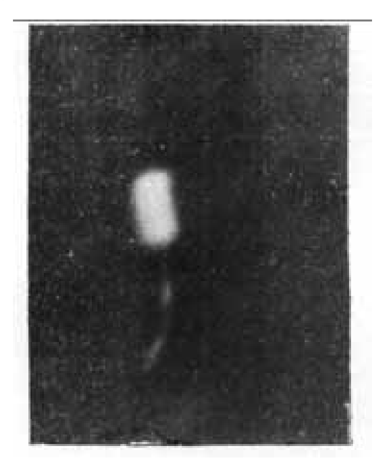
D_3　1×

图 1　噬菌斑形态

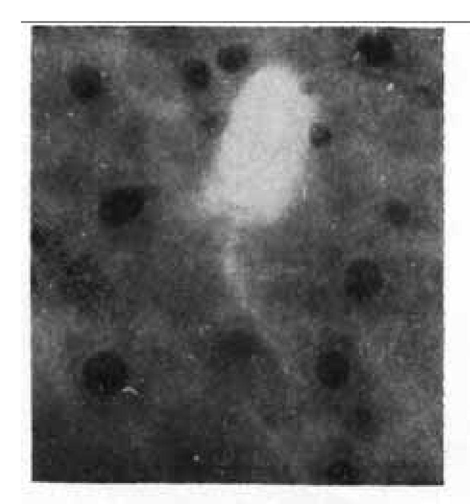


T_2 220,000×

G_8 220,000×



G_9 130,000×



G_5 220,000×



D_3 130,000×

图 2 噬菌体电子显微镜形态

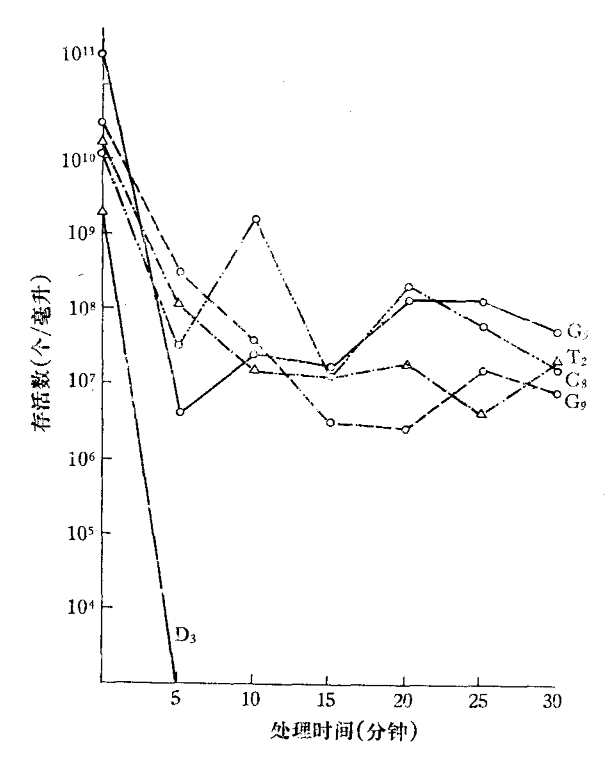


图 3　五种苏芸金杆菌噬菌体在 65°C 时的热稳定性

参　考　资　料

中国科学院北京动物研究所病理组 1973 昆虫病原细菌"010"的鉴定。昆虫学报 16 (1): 91。

中国科学院微生物研究所 1970 苏芸金杆菌抗噬菌体菌株的选育。微生物学革命资料汇编 第五集 19 页。

北京制药厂、中国科学院微生物研究所 1969 抗噬菌体的山梨糖发酵菌株的选育。微生物学革命资料汇编 第二集 76 页。

刘崇乐等 1962 苏芸金杆菌研究的五十年。

Adams, M. H. 1959 Bacteriophages. New York, In terscience publishers, Inc.

Chapman, H. M. and J. R. Norris 1966 Four new bacteriophages of *Bacillus thuringiensis*. *J. appl. Bact.* **29** (3): 529—35.

Colasito, D. J. and M. H. Rogoff 1969 Characterization of lytic bacteriophages of *Bacillus thuringiensis*. *J. Gen. virol.* **5** (2): 267—74.

Yoder, P. E. and E. L. Nelson 1960 Bacteriophage for *Bacillus thuringiensis Berliner* and *Bacillus anthracis Cohn*. *J. Insect pathol.* **2**: 198.

Раутенштейн, Я. И. 等 1971 Особенности лизогении и умеренных фагов культур спороносых кристаллооброзующих энтомопатогенных микроорганизмов, выделенных из разных источников Микробиология **40** (3): 532—39.

Раутенштейн, Я. И. 等 1964 Лизогения культур *Bac. cereus* var. *galleriae* и особенности содержащихя в них фагов Микробиология 33 (6): 980—86.

STUDIES ON PHAGE-RESISTANT STRAINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *GALLERIAE* "010" AND THE PHAGES OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

SHA CHA-YUN REN GAI-XIN XIE QIANG-JIANG

(Peking Institute of Zoology, Academic Sinica)

The screening of the phage-resistant strains was carried out by using phage G_9 and phage-sensitive strain *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae* "010". As a result, three phage-resistant strains have been obtained, namely R_{03-2}, R_{62-5} and R_{29-2}. They show good resistance to phage G_9, are normal in fermentation, and still possess the virulence and biological characteristics of the oringinal strain "010".

Aside from the screening work, 38 samples of bacteriophages of *Bacillus thuringiensis* were collected from Peking, Wuhan, Changsha, Kwangchow and Shanghai. They were isolated from various sources related to *Bacillus thuringiensis*. The phages were grouped according to the morphology of plaques and host spectra and five representative phages were selected to study the morphology by electron microscopy and test their heat inactivation. Our study showed that these bacteriophages were distinct groups.

It was observed that after treatment at 65°C in different durations most phage particles were inactivated, but after a storage at 4°C for 24 hours immediately following the treatment some phage particles will recover their adsorbing ability and cause more plaques in the plate than those which have been treated with 65°C only.